

Białystok, dnia 03.12.2023

Szanowny Pan

prof. zw. dr hab. n. med. Marcin Roszkowski

Z-ca Przewodniczącego Rady Naukowej

Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”

Prof. dr hab. n. med. Barbara Głowińska-Olszewska
Klinika Pediatrii, Endokrynologii,
Diabetologii z Pododdziałem Kardiologii
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. Waszyngtona 17
15-274 Białystok
tel: 857450737, kom: 607676250

Szanowny Panie Profesorze,

Niniejszym przesyłam recenzję rozprawy na stopień naukowy doktora nauk medycznych,
mgr Agnieszki Małgorzaty Ochocińskiej,

pt.: „ Poszukiwanie potencjalnych biomarkerów przebiegu cukrzycy typu 1 u dzieci”

Łączę wyrazy szacunku

Barbara Głowińska-Olszewska

Ocena

rozprawy na stopień naukowy doktora nauk medycznych,

mgr Agnieszki Małgorzaty Ochocińskiej, pt.: „ Poszukiwanie potencjalnych biomarkerów przebiegu cukrzycy typu 1 u dzieci”,

promotor: prof. dr hab. n. med. Bożena Cukrowska, promotor pomocniczy: dr hab. Marta Wysocka-Mincewicz

Cukrzyca typu 1 (T1D) stanowi 10-20% wszystkich przypadków cukrzycy i jest najczęstszą nieuleczalną chorobą przewlekłą wieku rozwojowego. Konsekwencją wieloletniej hiperglikemii w przebiegu choroby jest występowanie późnych powikłań, objawiających się zmianami w małych, a także dużych naczyniach (mikro- i makroangiopatie), dotyczących wszystkich narządów i układów. Czynnościowe zmiany w mikrokrążeniu są odwracalne, dlatego też poszukuje się markerów do identyfikacji wczesnych stadiów zaburzeń biochemicznych wskazujących na początkowe stadia dysfunkcji śródbłonna. W ostatnich latach w patogenezie T1D podkreśla się również znaczenie zmian składu mikrobioty jelitowej, prowadzących do zaburzeń funkcjonowania bariery jelitowej i aktywacji procesów zapalnych. Ze względu na ogromny wpływ późnych powikłań na jakość życia pacjentów z T1D, ważne jest poszukiwanie wczesnych markerów uszkodzenia tkanek, które mogą wskazać na pacjentów predysponowanych do danego typu powikłań lub ich wcześniejszego rozwoju. W bardzo aktualny i niezwykle potrzebny nurt badań nad wczesnymi biomarkerami przebiegu cukrzycy typu 1 u dzieci i młodzieży, ze szczególnym uwzględnieniem powikłań przewlekłych wpisuje się rozprawa doktorska mgr Agnieszki Ochocińskiej. Badania zrealizowane zostały w ramach zadania służącego rozwojowi młodych naukowców (M41/19 – Znaczenie wybranych peptydów i białek biologicznie czynnych w przebiegu cukrzycy typu 1 u dzieci: wpływ przestrzegania i nieprzestrzegania ścisłej kontroli glikemii; doktorantka uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej przy Instytucie „Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka” nr 18/KBE/2019).

Podstawę przedstawionej mi do oceny dysertacji doktorskiej stanowią trzy publikacje, w formie cyklu prac, wszystkie napisane w języku angielskim:

1. Praca pogładowa

Ochocińska, A.; Wysocka - Mincewicz, M.; Cukrowska B. Autoantibodies against islet cell antigens - current diagnostic possibilities/Autoprzeciwciała przeciwko antygenom komórek wysp trzustkowych – aktualne możliwości diagnostyczne, *Diagn Lab.* 2022; 58 (3): 114-119.
doi: 10.5604/01.3001.0016.3189 **Punktacja MNiSW: 40**

2. Praca oryginalna

Ochocińska, A.; Wysocka - Mincewicz, M.; Groszek, A.; Rybak, A.; Konopka, E.; Bierała, J.B.; Trojanowska, I.; Szałecki, M.; Cukrowska, B. Could I-FABP Be an Early Marker of Celiac Disease in Children with Type 1 Diabetes? Retrospective Study from the Tertiary Reference Centre. *Nutrients* 2022, 14, 414. doi: 10.3390/nu14030414 **Impact Factor: 6.706 Punktacja MNiSW: 140**

3. Praca oryginalna

Ochocińska, A.; Wysocka-Mincewicz, M.; Świdarska, J.; Cukrowska, B. Selected Serum Markers Associated with Pathogenesis and Clinical Course of Type 1 Diabetes in Pediatric Patients – The Effect of Disease Duration. *J. Clin. Med.* 2023, 12, 2151. doi: 10.3390/jcm12062151
Impact Factor: 4.964 Punktacja MNiSW: 140

łącznie punktacja cyklu prac wynosi **Impact Factor: 11.671, punktacja MNiSW: 320**

We wszystkich publikacjach doktorantka jest pierwszym autorem, co świadczy o jej wiodącym udziale w opisywanym projekcie. Stosowną dokumentację poświadczającą wkład w powstanie prac Doktorantka dołączyła do opracowania.

Uwagę zwraca praca poglądowa, nie do końca spójna tematycznie z dwoma pracami oryginalnymi. Wpisuje się co prawda w temat główny – poszukiwania biomarkerów przebiegu cukrzycy typu 1 u dzieci, bowiem przebieg cukrzycy typu 1 jest wielofazowy i wieloletni. Praca poglądowa, skądinąd bardzo ciekawie napisana, dotyczy fazy najwcześniejszej – i samej diagnostyki procesu autoimmunizacyjnego, pozostałe dwie prace dotyczą faz późniejszych - markerów powikłań przewlekłych i markerów przebiegu wieloletniej cukrzycy. Zadaniem recenzenta, zdecydowanie bardziej pasowało by w tej dysertacji opracowanie, w formie pracy poglądowej, dotyczące właśnie tych markerów badanych później w pracach oryginalnych.

Rozprawę doktorską mgr Agnieszki Ochocińskiej stanowi opracowanie liczące w sumie 87 stron wraz z załączonymi wspomnianymi trzema publikacjami. Praca rozpoczyna się od spisu publikacji, krótkiego spisu treści, następnie zawiera kolejno: streszczenia w języku polskim i angielskim, słowa kluczowe oraz wykaz stosowanych skrótów. Kolejnymi częściami są wstęp, całościowo przedstawione cele rozprawy oraz materiał i metody, załączone kopie trzech publikacji, omówienie wyników publikacji, wnioski z całości opracowania, oraz wykaz piśmiennictwa (piśmiennictwo głównie anglojęzyczne, pochodzące z ostatnich lat, dobrze dobrane we wszystkich opublikowanych pracach).

Wstęp opracowania jest nie jest skrótem pracy poglądowej, natomiast Doktorantka w zwięzły sposób opisuje w nim badane w pracach oryginalnych markery przebiegu choroby i powikłań przewlekłych.

W opracowaniu wstępu pojawiło się kilka nieprecyzyjnych sformułowań:

- strona 15: „... wynika z indukowanego przeciwciałami niszczenia komórek beta...” – wykrywane przeciwciała są raczej markerami toczącego się procesu autoimmunizacyjnego, nie zaś bezpośrednim czynnikiem sprawczym.

- strona 16 :”... uznający hiperglikemię za główny czynnik rozwoju T1D...” Hiperglikemia jest wynikiem /skutkiem rozwoju cukrzycy nie zaś jej czynnikiem sprawczym.

- strona 16: „...dotychczas nierozpoznane cele terapeutyczne...”. W opinii recenzenta wszystkie współczesne cele terapeutyczne, również te pozaglikemiczne dotyczące leczenia cukrzycy typu 1 u dzieci są precyzyjnie rozpoznane i opisane w aktualnych wytycznych PTD oraz ISPAD.

Zasadniczym celem badań mgr Agnieszki Ochocińskiej było poszukiwanie potencjalnych wczesnych biomarkerów zaburzeń metabolizmu w T1D u dzieci.

W publikacji: **Could I-FABP Be an Early Marker of Celiac Disease in Children with Type 1 Diabetes? Retrospective Study from the Tertiary Reference Centre** (Ochocińska i wsp., *Nutrients*, 2022) doktorantka oceniała, czy jelitowe białko I-FABP może być wczesnym markerem celiakii (CD) - choroby autoimmunizacyjnej o wspólnej patogenezie genetycznej z T1D, w której potwierdzono upośledzoną funkcję bariery śluzówkowej. Celem zaś pracy **Selected Serum Markers Associated with Pathogenesis and Clinical Course of Type 1 Diabetes in Pediatric Patients – The Effect of Disease Duration** (Ochocińska i wsp., *J. Clin. Med.*, 2023) była ocena stężeń wybranych substancji czynnych (IAPP, proIAPP, CST, ChgA, I-FABP, NGF, PAF, oraz UMOD), których udział w patogenezie i przebiegu T1D oraz

jej powikłań jest znany lub postulowany oraz skorelowanie stężeń tych wskaźników z czasem trwania T1D, jak również porównanie ze stężeniami u osób zdrowych. Cele obu prac sformułowane są jasno i precyzyjnie.

W opisie części pacjenci i metody, zarówno w opracowaniu, jak i pracach opublikowanych brakuje informacji o sposobie rekrutowania i pochodzeniu dzieci zdrowych z grupy kontrolnej. W pierwszej pracy oryginalnej Doktorantka zrekrutowała 156 pacjentów z T1D, 51 pacjentów z T1D i aktywną postacią CD (T1D-CD) oraz 38 pacjentów z aktywną CD bez T1D. Rzeczywiście unikatową grupę stanowiło 22 pacjentów z T1D, z ujemnymi markerami serologicznymi CD w chwili rozpoznania, u których dzięki corocznemu przesiewowi zdiagnozowano CD. Ponadto wśród pacjentów (T1D-CD) oraz u pacjentów z aktywną CD wyodrębniono podgrupę pacjentów, którzy stosowali GFD przez co najmniej 6 miesięcy. Wydzielenie tych kilku klinicznie różnych grup badanych pozwoliło mgr Agnieszce Ochocińskiej na uzyskanie i opracowanie ciekawych i oryginalnych wyników.

W drugiej pracy oryginalnej Autorka przeprowadziła badania również w grupie 156 pacjentów z T1D. Wyodrębniła 30 dzieci z nowo rozpoznaną T1D oraz 126 pacjentów z T1D trwającą ponad 3 lata. Pacjentów długo chorujących (>3 lat) podzieliła dodatkowo według czasu, jaki upłynął od rozpoznania T1D wyodrębniając tych bez spodziewanych powikłań (pierwsze 3–5 lat choroby), pacjentów z prawdopodobieństwem wykrycia pierwszych wczesnych biochemicznych markerów powikłań (6–7 lat choroby) oraz pacjentów, u których subkliniczne powikłania mogłyby być wykryte (>7 lat choroby). Podział na te trzy grupy jest wysoce spekulacyjny, i raczej nie spotykany w piśmiennictwie. Zwyczajowo badane grupy są dzielone ze względu na czas trwania cukrzycy na poniżej i powyżej 10 lat, lub co pięć lat. Oczywiście doktorant ma prawo zaprojektować i analizować własny układ grup ze względu na czas trwania choroby, jednak w tym przypadku – przedziały czasowe 3-5, 5-6, i powyżej 7 lat są zdecydowanie za wąskie.

W pierwszej pracy oryginalnej (*Ochocińska i wsp., Nutrients, 2022*) Doktorantka oceniała stężenia I-FABP w surowicy pacjentów z T1D, pacjentów z T1D i aktywną CD oraz pacjentów z aktywną CD bez T1D. Nie wykazała jednak istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami pacjentów z: T1D, T1D-CD, CD bez T1D. Znaczenie białka I-FABP w wykrywaniu CD u pacjentów z T1D oceniła analizą krzywej ROC otrzymując pole pod krzywą (AUC) na poziomie 0,557. Dla stężenia I-FABP w surowicy wynoszącego >965 pg/ml (oszacowanego jako związane ze współistnieniem obu chorób) wykazała czułość i swoistość na poziomie 51,7 i 59,7%. W drugim mgr Agnieszka Ochocińska etapie oceniała wpływ stosowania diety bezglutenowej (GFD) na stężenie białka I-FABP u pacjentów z T1D i aktywną CD oraz u pacjentów z aktywną CD bez T1D. Stężenie I-FABP w surowicy było istotnie statystycznie niższe u pacjentów przebywających na GFD, bez względu na jednostkę chorobową, w porównaniu z pacjentami niestosującymi GDF i osiągało wartości zbliżone dla grupy kontrolnej dzieci zdrowych. I ostatecznie Doktorantka analizowała stężenia I-FABP przed rozpoznaniem CD u pacjentów z rozpoznaną T1D. Średnia wartość I-FABP w podgrupie pacjentów z ujemnym wynikiem serologicznym CD na rok przed rozpoznaniem CD (T1D-CD-1) nie różniła się istotnie statystycznie od pacjentów z T1D. Różniła się jednak istotnie od grupy kontrolnej i pacjentów z T1D-CD po leczeniu GFD.

Na tej podstawie doktorantka wyciągnęła słuszne wnioski, że I-FABP nie może być wczesnym markerem CD u chorych z T1D, gdyż uszkodzenie bariery nabłonkowej jelita u pacjentów z T1D występuje niezależnie od rozwoju CD. Ocena stężeń I-FABP w kontekście stosowanej GFD pozwala sugerować, że gluten może być szkodliwy i indukować procesy autoimmunizacyjne nie tylko u

pacjentów z CD, ale także u chorych z innymi chorobami autoimmunizacyjnymi, w tym T1D. Otwartym pozostaje pytanie czy GFD może być skuteczna u pacjentów z T1D bez CD.

W analizie statystycznej doktorantka potwierdza nieparametryczny rozkład badanych zmiennych oraz stosuje nieparametryczne testy statystyczne, konsekwentnie należałoby wyniki przedstawić w formie mediana- rozstęp kwartyłowy, zwyczajowo stosowany przy zmiennych nie spełniających kryteriów rozkładu normalnego. Zabrakło również wyników hemoglobiny glikowanej, zarówno w opisie charakterystyki badanych grup, jak i ewentualnie w późniejszej analizie.

W drugiej pracy oryginalnej (*Ochocińska i wsp.*, J. Clin. Med., 2023) mgr Agnieszka Ochocińska wyodrębniła na podstawie czasu trwania choroby 4 podgrupy. Różniły się one istotnie statystycznie pod względem parametrów biochemicznych odzwierciedlających metabolizm węglowodanów, metabolizm lipidów, jak również kreatyniny. Zastanawia sens oznaczenia stężenia insuliny, gdzie wiadomo, iż oznaczone stężenie pochodzi z insuliny podawanej podskórnie jako lek. Z kolei warto byłoby przeanalizować badane parametry w zależności od dobrego lub złego wyrównania metabolicznego choroby, czy zapotrzebowania na insulinę w przeliczeniu na kg masy ciała.

W dalszym etapie analizy oceniano stężenia wybranych substancji czynnych u pacjentów z T1D i w grupie HC. Z wyjątkiem stężenia UMOD i NGF, stężenia badanych substancji były istotnie statystycznie wyższe w grupie T1D w porównaniu z HC. W przypadku NFG różnice między grupą T1D a HC nie były znaczące. Porównując stężenia badanych substancji u dzieci z nowo rozpoznaną T1D w porównaniu z grupą dzieci z T1D leczonych przez co najmniej 3 lata wykazano, że czas trwania T1D wpływał na stężenie NGF, ChgA i PAF. Stężenie PAF było znacznie niższe w nowo zdiagnozowanej T1D w porównaniu z pacjentami z T1D trwającą > 3 lata. Mgr Agnieszka Ochocińska nie zaobserwowała wpływu czasu trwania choroby na stężenie IAPP, proIAPP i I-FABP, ale stężenia każdej substancji różniły się istotnie statystycznie pomiędzy pacjentami z T1D (w każdej podgrupie) i HC, z wyjątkiem UMOD. Natomiast na stężenia CST, ChgA, PAF i NGF istotnie statystycznie wpływał czas, jaki upłynął od rozpoznania, a kierunek zmian zależał od rodzaju biomarkera.

Pomiar stężeń wybranych markerów w różnych stadiach rozwoju choroby pozwolił spojrzeć na problem szerzej i potwierdził wcześniejsze przypuszczenia dotyczące roli wybranych markerów w T1D. Badania Doktorantki jednoznacznie potwierdzają, że substancje, na których stężenie nie miał wpływu czas trwania choroby są zaangażowane w patomechanizm T1D (proIAPP, IAPP, I-FABP), natomiast biomarkery takie jak CST, ChgA, PST i NGF - których stężenia były zróżnicowane w zależności od czasu rozpoznania T1D, są związane z przebiegiem T1D i mogą odzwierciedlać biochemiczny początek późnych powikłań, co wymaga dalszych badań określających ich wartość diagnostyczną.

Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę Doktorantki na rozbieżność pomiędzy opisywanymi metodami statystycznymi, a wynikami. W opisie analizy statystycznej Doktorantka pisze, że statystyki opisowe przedstawiono jako średnia i odchylenie standardowe, tymczasem w tabeli nr 1, zawierającej elementy danych opisowych wyniki przedstawione są jako mediana i rozstęp kwartyłowy (i tak opisane w stopce tabeli). W tej pracy, w przeciwieństwie do pierwszej – wyniki analizowanych biomarkerów – są przedstawione graficznie zgodnie z opisywanym w analizie statystycznej nieparametrycznym rozkładem.

Całość doktoratu kończy wspólne dla obu prac oryginalnych podsumowanie, w którym mgr Agnieszka Ochocińska w skondensowany, dojrzały i krytyczny sposób podsumowuje wyniki swoich badań odnosząc się jednocześnie do oryginalnych dyskusji prac opublikowanych.

Na podstawie przeprowadzonych badań doktorantka wyciągnęła wnioski w pełni odpowiadające postawionym celom i poparte wynikami prac:

1. Ocena stężenia I-FABP w surowicy pacjentów z T1D może być wykorzystywana jako niezależny marker przepuszczalności jelitowej, jednak marker ten nie może być wykorzystywany do przewidywania zachorowania na CD, gdyż problem nieszczelności bariery nabłonkowej jelita występuje u chorych z T1D niezależnie od rozwoju CD.
2. Stężenia w surowicy krwi niektórych z badanych substancji (CST, ChgA, PAF i NGF) zależą od czasu trwania T1D, co może wskazywać na ich przydatność w procesie prognozowania ewentualnych powikłań w trakcie przebiegu T1D, jednak niezbędny jest dłuższy czas obserwacji pacjentów ze względu na brak powikłań w grupie badanych dzieci z T1D.
3. Dla potwierdzenia użyteczności praktycznej wskazanych biomarkerów należy kontynuować badania w zakresie ustalenia ich wartości referencyjnych w populacji dzieci zdrowych oraz analiz korelacji badanych substancji w odniesieniu do kontroli glikemii i innych parametrów biochemicznych.

Całość pracy, w tym załączone opublikowane prace przeczytałam z dużym zainteresowaniem, jej treść świadczy o dojrzałych umiejętnościach Doktorantki dotyczących planowania i realizacji zadań badawczych, prowadzenia merytorycznej dyskusji oraz wyciągania prawidłowych wniosków. Prace oryginalne zawierają precyzyjnie opisane kryteria włączenia i wykluczenia z badań, tabele oraz ryciny graficznie ilustrujące opisywane wyniki (w pracach oryginalnych), a także bogate światowe piśmiennictwo dotyczące podjętej tematyki. Bardzo ciekawe dyskusje obu prac oryginalnych świadczą o dużej wiedzy teoretycznej, natomiast zawarte w obu pracach oryginalnych akapity – ograniczenia i siła badania świadczą o umiejętności doktorantki do krytycznego spojrzenia na własne wyniki. Oceniana dysertacja niewątpliwie stanowi nowatorskie rozwiązanie podjętego problemu naukowego. Poczynione uwagi krytyczne nie umniejszają w niczym wysokiej wartości ocenianej pracy.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Agnieszki Ochocińskiej spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. z 2018, poz. 1668 ze zm.). W związku z tym mam zaszczyt przedstawić Radzie Naukowej Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” wniosek o dopuszczenie mgr Agnieszki Ochocińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

Uzasadnienie

1. Opublikowanie wyników badań w postaci trzech, wysoko punktowanych prac, we wszystkich doktorantka jest pierwszym, wiodącym autorem (Sumaryczny Impact Factor: 11.671, sumaryczna punktacja MNiSW: 320)
2. Oryginalny pomysł i nowatorskie opracowanie całości rozprawy.

Białystok, 3.12.2023

Prof. dr hab. Barbara Głowińska-Olszewska

